

文章编号: 1000-3851(2008)06-0059-04

Tat 修饰 Au-Au₂S 纳米颗粒的合成及其穿膜机制乔永萍¹, 王祖勇¹, 张亚菲¹, 刘 雯¹, 赵 阳¹, 王 林¹, 任 磊^{*1,2}, 张其清^{1,3}

(1. 厦门大学 材料学院 生物材料系, 生物医学工程中心, 厦门 361005; 2. 厦门大学 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005; 3. 中国医学科学院 中国协和医科大学 生物医学工程研究所, 天津 300192)

摘 要: 为了实现对肿瘤的靶向性药物/基因治疗, 通过化学还原法制备了细胞穿膜肽 Tat 修饰的 Au-Au₂S 纳米药物载体。采用透射电镜、表面增强拉曼光谱仪、紫外分光光度计对 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子进行表征, 采用流式细胞仪、激光共聚焦显微镜研究 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子的穿细胞膜机制。理化分析结果表明, Tat 可通过 Au-S 键接枝于 Au-Au₂S 纳米粒子表面, 直径约 50 nm 的 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子具有近红外敏感性。细胞内化途径示踪物共定位分析和抑制剂阻断实验表明, Tat/Au-Au₂S 纳米粒子以脂筏介导的巨胞饮途径进入 Hela 细胞, 而以受体和脂筏共介导的巨胞饮途径进入骨髓间充质干细胞(BMSCs)。

关键词: Au-Au₂S; 纳米药物载体; Tat; 穿膜机制

中图分类号: TB39 **文献标志码:** A

Synthesis and cellular uptake mechanism of Tat decorated Au-Au₂S nanoparticlesQIAO Yongping¹, WANG Zuyong¹, ZHANG Yafei¹, LIU Wen¹, ZHAO Yang¹,
WANG Lin¹, REN Lei^{*1,2}, ZHANG Qiqing^{1,3}

(1. Research Center of Biomedical Engineering, Department of Biomaterials, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surfaces, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Department of Biomaterials, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract: To realize an efficient and targeted cancer therapy by the drug/ gene carrier, cell penetrating peptide Tat decorated Au-Au₂S nanoparticles were prepared by a redox method. Transmission electron microscopy (TEM), surface-enhanced Raman scattering (SERS) and UV-vis spectrometer were used for characterizing Tat/Au-Au₂S nanoparticles, and confocal laser scanning microscope (CLSM) and flow cytometer (FACS) were used to investigate the mechanism of cellular uptake. The chemicophysical results indicate that Tat peptide could be conjugated onto Au-Au₂S nanoparticles via Au-S bonds, and Tat/Au-Au₂S nanoparticles present as 50 nm-diameter sphericities with NIR sensitivity. Co-location and endocytosis inhibition experiments suggest that Tat/Au-Au₂S nanoparticles may enter Hela cells via a lipid raft mediated endocytosis pathway, whereas via a combined endocytosis pathway of lipid raft-dependent and receptor-dependent into bone marrow stromal cells (BMSCs).

Keywords: Au-Au₂S; drug nano-carrier; Tat peptide; cell uptake mechanism

金制剂和胶体金已广泛用于生物医学。由于胶体金毒副作用小以及对细胞外基质表现出特异结合等特性, 启发了人们将纳米金颗粒作为药物和基因的载体, 用于恶性肿瘤的诊断和治疗^[1]。Ren 等人已成功制备了具有良好生物相容性和近红外敏感性的 Au-Au₂S 金纳米壳材料作为抗肿瘤药物顺铂的载体, 并可通过调控近红外光来激发顺铂的释

放^[2-4]。近年来发现一种来源于人类免疫缺陷病毒 HIV-1 Tat (Transactivator transcription) 蛋白的蛋白功能区, 称之为蛋白传递区段 (Protein transduction domain, PTD), 能够有效地引导蛋白质甚至纳米粒子进入细胞, 并可靶向细胞核^[5-7]。如果载有药物或基因的 Au-Au₂S 纳米粒子也能够在此 Tat 多肽介导下有效进入细胞, 可大大提高其临床

收稿日期: 2008-03-06; 收修改稿日期: 2008-05-27

基金项目: 973 计划项目 (2007CB935603); 国家自然科学基金 (30670559); 福建省自然科学基金 (2006J0121); 福建省新世纪优秀人才计划

通讯作者: 任 磊, 教授, 主要研究方向为生物材料 E-mail: renlei@xmu.edu.cn

应用前景。本研究中制备了具有近红外敏感性的 Au-Au₂S 纳米粒子, 并利用巯基(-SH)容易与 Au 结合的特点, 将细胞穿膜肽 Tat 结合到 Au-Au₂S 表面。本文中重点探讨了 Tat 修饰的 Au-Au₂S 纳米粒子在骨髓间充质干细胞(BMSCs)和人宫颈癌 Hela 细胞中的内化机制及其影响因素。

1 实验部分

1.1 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子的合成

将 2 mmol/L 的 HAuCl₄ 和 1 mmol/L 的 Na₂S 在室温以等体积混合, 即可得到 Au-Au₂S 纳米粒子溶液。向 1 mg/mL 的 Au-Au₂S 溶液中加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 Tat 使其终浓度为 50 μg/mL, 避光过夜反应。最后超声、离心, 并重复洗 2 次。用透射电镜(TEM, JEM 2100)来检测所制备的纳米颗粒的形貌; 用紫外分光光度计(DU800, Beckman)和表面增强拉曼光谱仪(Dilor, LabRam 型共焦显微拉曼系统)来检测所制备的纳米粒子的结构。

1.2 BMSCs 取材及培养

在无菌条件下取 4~8 周龄新西兰兔胫骨骨髓 5 mL, 并迅速与含 5000 U/L 肝素的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL 混合, 然后注入含有 1.073 kg/L 的淋巴细胞分离液的离心管中, 离心并收集有核细胞层。之后用 PBS 洗涤 1 次, 再加入含 10 vol % 胎牛血清(FBS)、1 vol % 双抗的细胞培养基 DMEM 吹打成细胞悬液。最后, 将得到的细胞悬液接种到 100 mm 培养皿中, 于 37 °C、5 vol % CO₂、饱和湿度的培养箱中进行培养。5 天后细胞首次换液, 以后每 3 天换液 1 次, 约 2 周细胞基本铺满单层, 用 0.25 wt % 胰蛋白酶常规消化传代。第 3~6 代细胞用于实验。

1.3 激光共聚焦扫描显微镜观察 Tat/Au-Au₂S 的细胞内吞

将细胞接种到无菌盖玻片进行爬片培养。然后将 FITC 标记 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子(100 μg/mL)和红色荧光标记的转铁蛋白(Alexa Fluor 546-transferrin, 50 μg/mL)或红色荧光标记的霍乱毒素 B(Alexa Fluor 594-Ctx B, 10 μg/mL)用无血清的 DMEM 高糖培养基分别与细胞在 37 °C 共培养 5 h。用激光共聚焦扫描显微镜(CLSM, Leica SP2-MP2)观察荧光标记的 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子、转铁蛋白及霍乱毒素 B 在细胞分布的位置。

1.4 流式细胞仪定量检测 Tat/Au-Au₂S 的细胞内化

将细胞接种到六孔板, 向其中加入 100 μg/mL FITC 标记的 Tat/Au-Au₂S, 并用无血清的 DMEM 培养液在 37 °C 共培养 5 h。然后用 0.25 wt % 胰蛋白酶对细胞进行消化, 并用流式细胞仪(FACS)检测 20000 个细胞内化效率, 以未做任何处理的细胞作为空白对照。为了研究细胞内吞的抑制, 在 Tat/Au-Au₂S 与细胞共培养之前加入 0.5 wt % 叠氮化钠/2-脱氧葡萄糖(NaN₃/2-DG)或 10 μmol/L α-环糊精(α-CD)或 10 μmol/L 诺考达唑(Noc), 并预培养 1 h, 然后按上述同样的方法检测细胞内化效率。

2 结果与讨论

2.1 材料的表征

图 1 是 Tat/Au-Au₂S 纳米颗粒的透射电镜图, 可以观察到该纳米粒子的粒径约 50 nm, 呈球形, 表面光滑。图 2(a) 是紫外吸收光谱图。图中 527 nm 处是 Au-Au₂S 纳米粒子中 Au 表面等离子共振吸收峰, 766 nm 处是含有 S 的 Au 的近红外敏感吸收峰^[2]。在 Tat 修饰的 Au-Au₂S 的紫外吸收曲线中, 这 2 个特征峰依然存在, 说明 Tat 的引入并没有破坏 Au-Au₂S 的结构以及其近红外敏感性。因此, Tat 修饰的 Au-Au₂S 纳米粒子在药物控释方面有潜在的巨大应用前景。

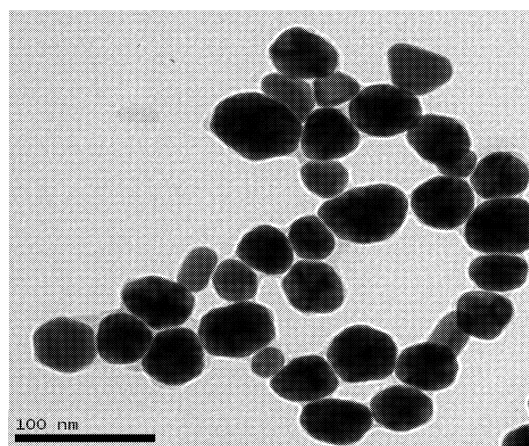


图 1 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子的透射电镜图

Fig. 1 TEM image of Tat/Au-Au₂S nanoparticles

图 2(b) 是 Au-Au₂S 及 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子的表面增强拉曼光谱(SERS)图。从图中可以观察到, 在 Au-Au₂S 曲线上未出现 Au-S 键的振动峰, 但是与 Tat 反应以后的纳米粒子在 280

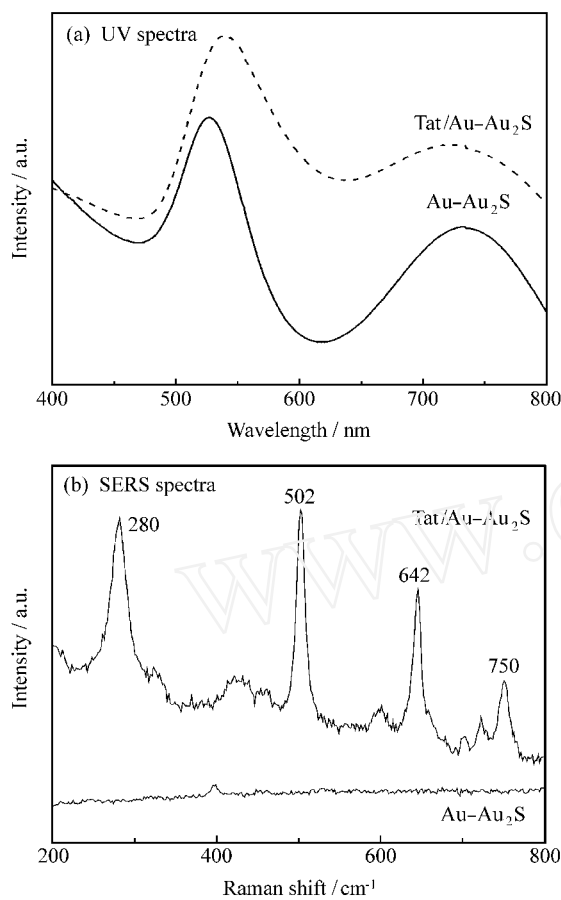


图2 Au-Au₂S 及 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子的紫外吸收光谱和表面增强拉曼光谱
Fig. 2 UV and SERS spectra of Au-Au₂S and Tat/Au-Au₂S nanoparticles

cm⁻¹处出现了很明显的 Au—S 的振动峰^[8], 其它的 502、642、750 cm⁻¹ 等处的峰为 Tat 官能团的振动峰, 所以表明 Tat 已经连接在 Au-Au₂S 纳米粒子表面。

2.2 Tat/Au-Au₂S 的细胞内吞方式

细胞内化可广义地认为是细胞以膜囊泡包裹形式将环境中生物大分子或纳米颗粒转运至细胞内的过程, 其过程包括由脂筏介导的巨胞饮, 或是由笼形蛋白(Clatrin)介导的受体内吞等方式。众多文献已经报道转铁蛋白(Transferrin)是以 Clathrin 蛋白受体介导的内化方式进入细胞^[9], 而霍乱毒素 B (Ctx B) 是以脂筏介导的巨胞饮方式进入细胞^[10]。为了研究 Tat 修饰的 Au-Au₂S 纳米粒子是以何种方式进入细胞的, 本研究中采用激光共聚焦扫描显微镜观察 FITC 标记(绿色荧光)的 Tat/Au-Au₂S 分别与 Alexa Fluor 546-标记(红色荧光)的转铁蛋

白、Alexa Fluor 594-标记(红色荧光)的霍乱毒素 B 在细胞内是否共定位。Hela 细胞株已广泛应用于肿瘤研究, 而骨髓基质干细胞(BMSCs)是存在于骨髓内的一种成体干细胞, 具有自我增殖、多向分化的潜能, 是进行组织修复的理想种子细胞和基因治疗的靶细胞。因此, 本文中选取具有临床研究意义的 Hela 细胞和 BMSCs 进行研究。

如图 3 的 CLSM 照片所示, 在 Hela 细胞中观察到绿色荧光点状的 Tat/Au-Au₂S 和红色荧光点状的转铁蛋白几乎都落在胞浆内不同位置, 而与红色荧光点状的霍乱毒素 B 在胞浆内叠加呈现黄色点状分布, 所以推测 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子是以脂筏介导的巨胞饮方式进入 Hela 细胞的。而在 BMSCs 中, 绿色荧光点状的 Tat/Au-Au₂S 与红色荧光点状的转铁蛋白和霍乱毒素 B 都有部分重叠, 所以推测 Tat/Au-Au₂S 纳米粒子是以受体和脂筏介导的巨胞饮 2 种内吞方式进入 BMSCs 的。前期的研究结果显示 Tat 是以脂筏介导的巨胞饮方式进入 Hela 细胞和 BMSCs 的^[11]。因此推测 Au-Au₂S 纳米粒子的引入并没有引起 Tat 穿膜机制的变化, Tat/Au-Au₂S 纳米粒子是依赖 Tat 的穿膜递送作用进行细胞内吞的。值得注意的是, Tat/Au-Au₂S 进入 BMSCs 的方式与 Tat 有差别: 它不仅是以脂筏介导的巨胞饮方式而且同时也以受体的方式进

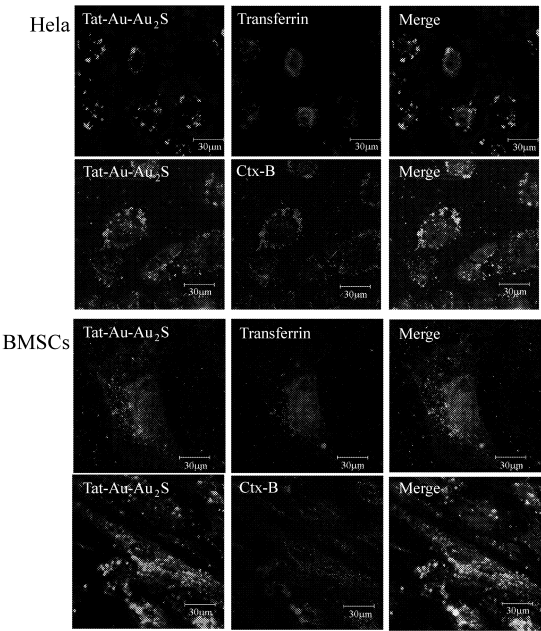


图3 绿色荧光标记 Tat/Au-Au₂S 与红色荧光标记转铁蛋白或霍乱毒素 B 分别在 Hela 细胞和 BMSCs 中共定位
Fig. 3 Tat/Au-Au₂S (green) co-located with transferrin (red) or Ctx B (red) in Hela cells and BMSCs, respectively

入, 其机制和影响因素还有待详细考察。

2.3 影响 Tat/ Au-Au₂S 穿膜递送的因素

叠氮化钠/ 2- 脱氧葡萄糖(NaN₃/ 2-DG)能破坏细胞膜上的三磷酸腺苷酶(ATP 酶), 可用于检测 Tat 进入细胞是否具有能量依赖性。诺考达唑可以抑制囊泡沿微管运输从而抑制细胞内吞, β - 环式糊精(β -CD)通过破坏细胞膜上的胆固醇成分来抑制脂筏介导的细胞内吞效率。采用流式细胞仪检测温度以及上述物质是否会抑制 Tat/ Au-Au₂S 进入细胞, 从而间接鉴定 Tat/ Au-Au₂S 进入细胞的方式。结果如图 4 所示, 以 37 时检测到的细胞荧光百分率为标准。当培养温度为 4 时, Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子的内化效率都有明显下降, 所检测到的细胞荧光百分率在 BMSCs 和 HeLa 细胞中仅分别为 37 时的 5.3% 和 7.9%。因此可以推测 Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子进入细胞是一种温度依赖的途径。采用抑制剂进行预处理后, BMSC 和 HeLa 细胞对 Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子的内化率均有所降低。对于 BMSCs, 抑制剂 NaN₃/ 2-DG 和 Noc 的抑制作用较为明显; 而对于 HeLa 细胞, NaN₃/ 2-DG 和 β -CD 的抑制作用较大。因此可以推测 Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子进入细胞具有较强的能量依赖性, 这与 Tat 内吞实验的结果类似^[11]。

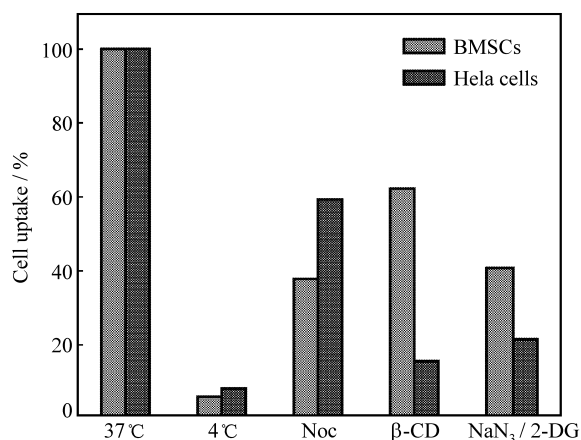


图 4 流式细胞仪检测 Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子的内吞抑制

Fig. 4 Uptake and endocytosis inhibition of Tat/ Au-Au₂S as determined by FACS analysis

3 结 论

(1) 合成的 Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子具有近红外敏感性。

(2) Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子能够进入细胞, 并且具有能量依赖性。

(3) Tat/ Au-Au₂S 纳米粒子以脂筏介导的巨胞饮途径进入 HeLa 细胞, 以受体和脂筏介导的 2 种巨胞饮途径进入骨髓间充质干细胞。

参考文献:

- [1] Thomas M, Klivanov A M. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9138-9143.
- [2] Ren L, Chow G M. Synthesis of nir-sensitive Au-Au₂S nanocolloids of drug delivery [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2003, 23: 113-116.
- [3] Ren L, Huang X L, Zhang B, et al. Cisplatin loaded Au-Au₂S nanoparticles for potential cancer therapy: Cytotoxicity, in vitro carcinogenicity, and cellular uptake [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, 85A: 787-796.
- [4] Huang X L, Zhang B, Ren L, et al. In vivo toxic studies and biodistribution of NIR sensitive Au-Au₂S nanoparticles as potential drug delivery carriers [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, 19: 2581-2588.
- [5] Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: Back to basics [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57: 559-577.
- [6] Gupta B, Levchenko T S, Tomhilin V P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57: 637-651.
- [7] Johanna R, Brian A, Teemu O I, et al. Internalization of novel non-viral vector Tat-streptavidin into human cells [J]. *BMC Biotechnology*, 2007, 7: 1-14.
- [8] Li G P, Hamilton I P. Infrared and Raman spectra for complexes of small cationic gold clusters and hydrogen sulphide [J]. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 2004, 49: 320-325.
- [9] Richard J P, Melikov K, Brooks H, et al. Cellular uptake of unconjugated Tat peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 15300-15306.
- [10] Vandenbroucke R E, De Smedt S C, Demeester J, et al. Cellular entry pathway and gene transfer capacity of Tat-modified lipoplexes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2007, 1768: 571-579.
- [11] Qiao Y P, Ren L, Wang L, et al. Tat Peptide enter bone marrow stem cells through a lipid raft macropinocytosis [J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2008, 47: 235-249.